

第 26 卷 第 4 期

海洋环境科学

Vol. 26, No. 4

2007 年 8 月

MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCE

Aug. 2007

# 苯并(a)芘、三丁基锡及其混合物 对褐菖鲉酚氧化酶活力的影响\*

刘睿智, 郑榕辉, 王重刚

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 以褐菖鲉为材料, 每周一次腹腔注射浓度为  $0.5 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$  和  $10 \times 10^{-6}$  的苯并(a)芘(BaP)、三丁基锡(TBT)及两者的等比例混合物, 观察鱼体肾脏、脾脏组织中酚氧化酶活力的变化。结果表明, 实验浓度的这些持续有机污染物在短期内对褐菖鲉肾脏、脾脏中的酚氧化酶活力有一定程度的诱导激活作用, 随着暴露时间的延长, 酶活力下降, 联合暴露可能会产生协同作用, 毒性增强, 诱发免疫毒性。

**关键词:** 苯并(a)芘; 三丁基锡; 酚氧化酶; 褐菖鲉

**中图分类号:** Q554 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2007)04-0305-04

## Effects of benzo(a) pyrene, tributyltin and their mixture on activities of phenoloxidase in *Sebastiscus marmoratus*

LU Rui-zhi, ZHENG Rong-hui, WANG Chong-gang

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The aim of our experiment was to study the effect of phenoloxidase of kidney and spleen on the activities of in *Sebastiscus marmoratus*. The abdominal injections of benzo(a) pyrene, tributyltin and their mixture were weekly done. The results showed that the following dose gradients of  $0.5 \times 10^{-6}$ ,  $1.5 \times 10^{-6}$  and  $10 \times 10^{-6}$  of body weight, the activities of phenoloxidase were induced during prophasic exposure, while reduced as the exposure continues. What's more, benzo(a) pyrene and tributyltin might cooperate each other in mixture, enhance their immune toxicity.

**Keywords:** benzo(a) pyrene; tributyltin; phenoloxidase; *Sebastiscus marmoratus*

海洋污染问题引起人们越来越多的重视。其中多环芳烃(PAHs)是一类广泛分布于海洋环境中的含有 2 个苯环以上的有毒有害污染物, 主要来源于人类活动和能源利用过程, 如石油、煤、木材等的燃烧, 石油及石油化工产品的生产等, 通过地面径流、污水排放及大气颗粒的沉降而进入海洋环境<sup>[1]</sup>; 有机锡最初用于聚氯乙烯(PVC)的稳定剂, 后来用作杀虫剂, 自有机锡的防污特性被发现后, 应用越来越广泛, 同时也对海洋非目标生物造成严重危害<sup>[2]</sup>。本试验所选用的苯并(a)芘[benzo(a) pyrene, BaP]是典型的具有强致癌性的多环芳烃, 三丁基锡(tributyltin, TBT)是有机锡中应用的比较广泛的一种。

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)或称酪氨酸酶, 1917年由 Bloch 首次发现, 人们已从多种动物体提取纯化并进行了鉴定<sup>[3]</sup>。当外来物入侵时, 酚氧化酶原被激活成酚氧化酶, 在外来物周围沉积形成黑色素, 通过包裹和黑化而限制外来损伤, 同时产生具有细胞毒作用的氧自由基和具有潜在细胞毒作用的半醌及三羟酚, 进一步增强宿主的防御能力。酚氧化酶是动物体体液免疫的重要因子, 对于无脊椎动物血淋巴中的酚氧化酶已有大量研究<sup>[4~6]</sup>, 但对鱼类酚氧化酶研究较少<sup>[7~9]</sup>。本文以褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)为试验材料, 研究腹腔注射 BaP、TBT 及两者混合物对褐菖鲉酚氧化酶活性的影响, 为了解有机污染物对海洋鱼类免疫机能的影响。

\* 收稿日期: 2005-10-18, 修订日期: 2005-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(20447001); 福建省自然科学基金(D0410007)

作者简介: 刘睿智(1976-), 女, 河南省南阳市人, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学。

影响提供一些参考资料。

## 1 材料与方法

实验仪器采用 Beckman J2-Mc 型冷冻离心机, UV300 紫外/可见分光光度计, BaP、L-dopa 购自 Sigma 公司, TB T 购自 Fruka 公司, 其余试剂为国产市售产品。

### 1.2 试验动物和暴露条件

褐菖鲉采于福建厦门海域, 体质量 28~48 g, 体长 7~12 cm。实验鱼先在清洁沙滤海水中暂养 7 d, 用充气机连续充气, 随后进行慢性污染实验。将 BaP、TB T 及两者的等质量混合物用橄榄油配制成  $0.5 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$  和  $10 \times 10^{-6}$  的储备液, 避光于 4℃ 保存。然后随机每 30 尾鱼分组, 称取个体质量, 按 1 mL/kg (相当于  $0.5 \times 10^{-6}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$  和  $10 \times 10^{-6}$ ) 进行腹腔注射。对照组 1 mL/kg 比例根据个体质量注射橄榄油。每隔 6 d 重复注射 1 次, 共注射 8 次。每隔 1 d 投喂新鲜文蛤 (*Meretrix meretrix*) 一次, 并于投喂后 2 h 清除食物残渣, 更换清洁海水。取样前 3 d 停止喂食。饲养期间水温 12~16℃, 盐度 22~24。

### 1.3 取样和样品预处理

污染实验开始后的第 7、14、28、56 d 采样, 分离出脾脏和肾脏, 加 4 倍体积 (kg/L) 预冷匀浆液 (用 0.01 mol/L 的 tris-HCl 配置成 1.15% 的 KCl 溶液, pH = 7.4), 于玻璃匀浆器中匀浆, 然后立即离心 (10 000 r/min, 4℃, 30 min), 取上清液用于测定酶活性。

### 1.4 酚氧化酶活力测定

以 L-dopa 为底物, 参照 Ashida<sup>[10]</sup> 的方法进行。将 0.1 mol/L、pH = 6.0 的磷酸钾盐缓冲液与 0.01 mol/L 的 L-dopa 100 μL 于室温下混匀, 每隔 2 min 测定其光密度值  $A_{490}$ , 以  $A_{490}$  对反应时间作图, 以试验条件下每分钟  $A_{490}$  增加 0.001 为一个酶活力单位。

蛋白含量测定采用 Bradford 的方法<sup>[11]</sup>, 以牛血清白蛋白 BSA 为标准物。

### 1.5 数据分析

实验数据用统计学方法进行处理。结果用平均值 ± 标准误差 (mean ± SDE) 表示, 组间数据用单尾 t 检验法进行比较,  $p < 0.05$  被认为有显著差异。

## 2 结果与讨论

实验过程中 BaP 暴露 56 d  $10 \times 10^{-6}$  组全部死亡; TB T 暴露 14 d  $10 \times 10^{-6}$  组全部死亡, 28 d 时  $5 \times 10^{-6}$  组全部死亡; 两者联合暴露 14 d 时  $10 \times 10^{-6}$  组全部死亡, 56 d 时  $5 \times 10^{-6}$  组全部死亡, 显示了

TB T 对褐菖鲉具有较高的毒性。

图 1、2 分别显示了 BaP 对褐菖鲉肾脏、脾脏酚氧化酶活性的影响。与对照组相比, 肾脏酚氧化酶活性有所上升, 14 d 时酶活性最高, 诱导激活作用显著,  $5 \times 10^{-6}$ 、 $10 \times 10^{-6}$  组酶活性分别达到溶剂对照组的 2.76 和 2.56 倍, 28 d 酶活性下降, 与对照组基本相同, 至 56 d 时又有所回升。脾脏酚氧化酶活性在开始的 7 d 就显著诱导,  $10 \times 10^{-6}$  组达到溶剂对照组的 1.87 倍, 此后慢慢降低。

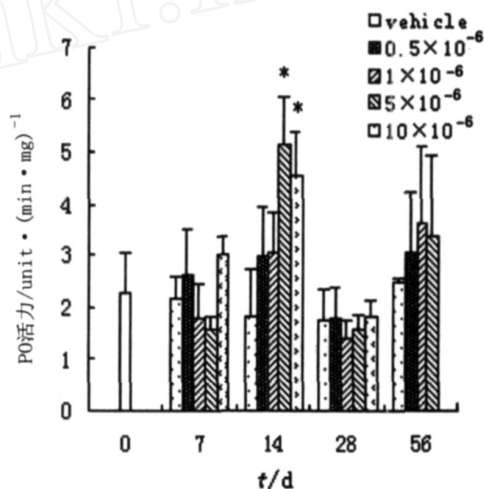


图 1 BaP 暴露对褐菖鲉肾脏酚氧化酶活性的影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 1 Effects of BaP treatment on PO activity in the kidney of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

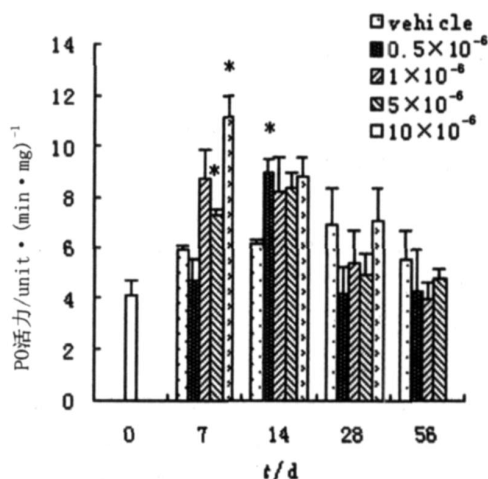


图 2 BaP 暴露对褐菖鲉脾脏酚氧化酶活性的影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 2 Effects of BaP treatment on PO activity in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

图 3、4 分别 TB T 暴露对褐菖鲉肾脏、脾脏酚氧化酶活性的影响。与对照组相比, 肾脏的酚氧

化酶活性增加。14 d 时  $0.5$ 、 $1 \times 10^{-6}$  组酶活性诱导显著。脾脏  $0.5 \times 10^{-6}$  组 14 d 时酶活性最高, 是对照组的 1.60 倍。但是到 28 d 时酶活性降低, 表现出显著抑制作用。

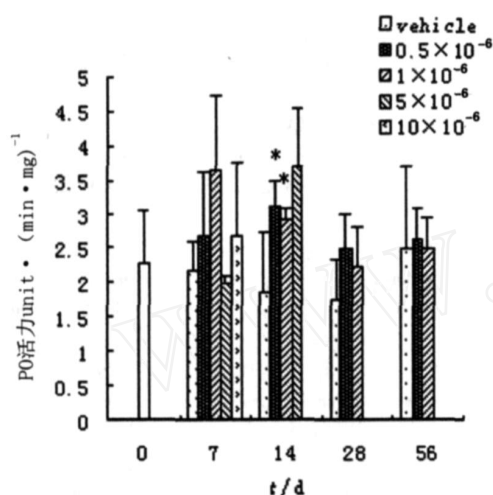


图 3 TBT 暴露对褐菖鲉肾脏中酚氧化酶活性的影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 3 Effects of TBT treatment on PO activity in the kidney of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

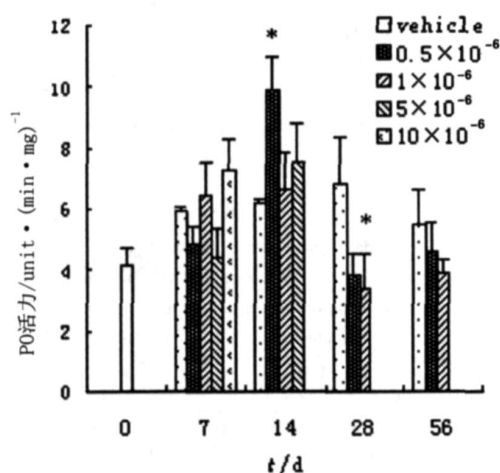


图 4 TBT 暴露对褐菖鲉脾脏中酚氧化酶活性影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 4 Effects of TBT treatment on PO activity in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

图 5、6 分别显示了两组联合处理对褐菖鲉肾脏、脾脏酚氧化酶活性的影响。可以看出, 联合暴露的 7、14 d, 肾酚氧化酶活力增加, 其中 7 d 时  $0.5 \times 10^{-6}$  组酶活性是对照组的 1.57 倍。28 d 时  $0.5 \times 10^{-6}$  酶活性是对照组的 2.30 倍, 但是随着时间的延长, 酶活性下降, 至 56 d 时显著降低, 表现出抑制作用。脾脏中酚氧化酶也显示出随着时间的延长活性先诱导后抑制的影响。

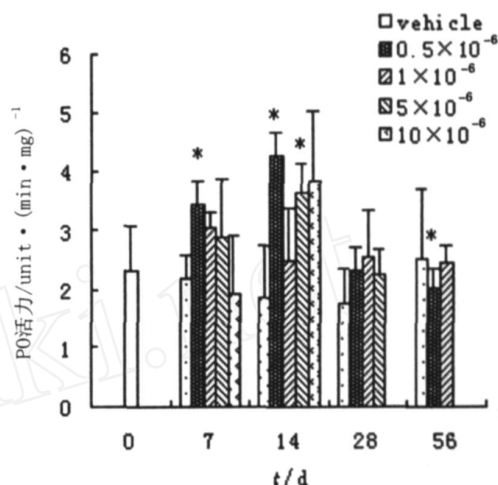


图 5 BaP/TBT 联合处理对褐菖鲉肾脏酚氧化酶活性的影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 5 Effects of the co-treatment with BaP and TBT on PO activity in kidney of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

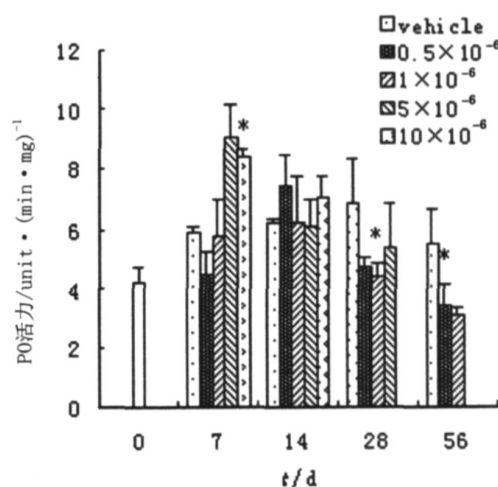


图 6 TBT 联合处理对褐菖鲉脾脏酚氧化酶活性的影响

\* 表示与溶剂对照组比较有显著差异

Fig. 6 Effects of the co-treatment with BaP and TBT on PO activity in the spleen of *Sebastiscus marmoratus*

\*  $p < 0.05$  vs the vehicle group

BaP 是一种非常普遍的水生环境污染物质, 其对鱼体免疫功能影响的研究甚少。Holladay 等观察到罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 在腹腔注射  $5 \times 10^{-6}$ 、 $25 \times 10^{-6}$ 、 $50 \times 10^{-6}$  的 BaP 后, 免疫组织细胞结构受到损伤<sup>[12]</sup>; 黑鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 注射  $20 \times 10^{-6}$  的 BaP 后脾脏和肾脏的巨噬细胞吞噬活性下降<sup>[13]</sup>、腹腔注射  $2 \times 10^{-6}$ 、 $20 \times 10^{-6}$ 、 $200 \times 10^{-6}$  的 BaP 后显著抑制日本青鳉鱼 (*Oryzias latipes*) 淋巴细胞的增殖、吞噬细胞的活性等<sup>[14]</sup>。本实验结果表明, 在腹腔注射 BaP 后褐菖鲉脾脏、肾脏的酚氧化酶活性均有一定程度的诱导, 并

随着暴露时间的延长出现降低的趋势。其倒“U”型趋势表明在触毒初期,鱼体产生较强的应激反应,在免疫系统的调节下酚氧化酶水平升高。随着暴露时间延长,鱼体的免疫机能逐渐耗竭,酶水平降低。

TBT对鱼体的免疫毒性已很多有报道。如幼年虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的脾脏和头肾细胞暴露在含 TBT 浓度为 50、500  $\mu\text{g/L}$  的细胞培养液中其细胞活性受到抑制<sup>[15]</sup>。Lee 等研究指出 TBT 暴露会造成机体细胞膜损伤,而吞噬作用和呼吸作用等都与膜刺激和信号转导有关,因而造成免疫应答的削弱或减少,产生免疫毒性<sup>[16]</sup>。本实验从体液免疫因子酚氧化酶活性变化角度进行研究,发现在注射 TBT 后褐菖鲉肾脏的酚氧化酶活性增加,低浓度 ( $0.5 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ ) 在 14 d 时对褐菖鲉酚氧化酶活性产生了显著的诱导,而脾脏中酶活性先诱导后抑制,28 d 时抑制作用显著。这与低剂量外源污染物刺激鱼体免疫力产生代偿性应激,高剂量或长时间暴露则超出其生理调节能力,产生免疫毒性的原理一致。实验也说明了 TBT 对褐菖鲉酚氧化酶的影响能力强于 BaP,对脾脏的影响大于肾脏。

随着 BaP、TBT 联合暴露时间的延长,酚氧化酶活性先诱导后抑制作用。从 BaP、TBT 单独暴露及联合暴露的结果来看,单独暴露没有表现出对肾脏明显免疫抑制作用,而联合处理 56 d 时  $0.5 \times 10^{-6}$  显著抑制,推测两者可能发生协同作用,导致毒性增强。

### 3 结 论

(1) 本实验以褐菖鲉作为材料,腹腔注射 BaP、TBT 及两者的等比例混合物后研究肾脏、脾脏中酚氧化酶活力的变化情况,结果表明短期内酶活力有一定程度的诱导激活作用,随着暴露时间的延长,酶活力下降,联合暴露可能会产生协同作用,毒性增强,诱发免疫毒性。

(2) 当前海洋环境污染日益严重,而且由于环境污染物数量和种类的增加,多种复杂污染物混合于水中,理化指标不能直接给出污染的生物学效应。通过鱼类的毒性实验并结合其它的水生生物监测,可以较为综合地反映水体的污染情况和污染物的毒性。

### 参考文献:

[1] SMPSON C D, MOSIA A, CULLEN W R. Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial ma-

- rine sediments from Kitimat Harbor, Canada[J]. The Science of the Total Environment, 1996, 181: 265-278.
- [2] FENT K, MULLER M D. Occurrence of organotins in municipal wastewater and sewage sludge and behavior in a treatment plant [J]. Environmental Science and Technology, 1991, 25: 489-493.
- [3] 李国荣,张士瑾,李红岩,等. 酚氧化酶研究概况—特性、功能、分布和在胚胎发育中的变化 [J]. 海洋科学, 2003, 27 (4): 4-8.
- [4] ASH DA M, KAWABATA T, HIRAYASU K. Method for assaying activity of prophenoloxidase activating enzyme and application thereof [J]. Biotechnology Advances, 1997, 15 (3-4): 699-700.
- [5] MUOZ P, MESEGUER J, ESTEBAN M. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species: Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20 (1): 12-19.
- [6] TUJULA N, RADFORD J, NAIR SV, et al. Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata* [J]. Aquatic Toxicology, 2001, 55 (3-4): 191-201.
- [7] 简纪常,叶剑敏,吴灶和. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响 [J]. 水生生物学报, 2004, 28 (1): 103-105.
- [8] 刘云,孙峰,王丹. 免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响 [J]. 海洋科学, 2004, 28 (9): 42-45.
- [9] 鄢庆彬,苏永全,王军,等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫功能影响的初步研究 [J]. 集美大学学报, 2001, 6 (2): 134-137.
- [10] ASH DA M. Purification and characterization from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144: 749-762.
- [11] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [12] HOLLADAY SD, SMITH SA, BESTEMAN E G, et al. Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1998, 64 (1): 69-82.
- [13] LEMARE-GONY S, LEMARE P, PULSFORD A L. Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquatic Toxicology, 1995, 31: 297-313.
- [14] CARLSON E A, LI Y, ZELIKOFF J T. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 56: 289-301.
- [15] O'HALLORAN K, AHODAS J T, WRIGHT P F A. Response of fish immune cells to in vitro organotin exposures [J]. Aquatic Toxicology, 1998, 40: 141-156.
- [16] LEE R F. Metabolism of TBT by marine animals and possible linkages to effects [J]. Marine Environmental Research, 1991, 32: 29-35.